

PCT/JP03/15546

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

04.12.03

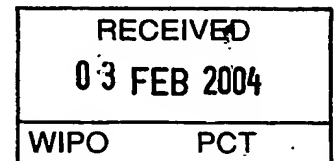
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年12月 5日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-354155
[ST. 10/C]: [JP2002-354155]

出 願 人
Applicant(s): 山之内製薬株式会社

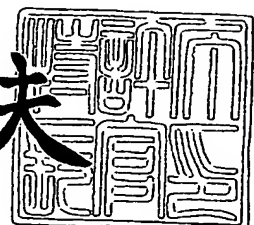


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月15日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
 【整理番号】 0000003215
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内
 【氏名】 遠藤 由規

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内
 【氏名】 遠藤 英樹

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内
 【氏名】 上田 能孝

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内
 【氏名】 加藤 美雪

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内
 【氏名】 井鍋 一則

【特許出願人】

【識別番号】 000006677
 【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089200
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 長井 省三

【選任した代理人】

【識別番号】 100109357

【弁理士】

【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005348

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 Akt2に結合する蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、Akt2と結合するポリペプチド、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなり、しかもAkt2と結合するポリペプチド。

【請求項2】 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項3】 請求項1又は請求項2に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項4】 請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項5】 請求項4に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Akt2に結合する新規なポリペプチド、及び該ポリペプチドをコードする新規なポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、及び該ベクターを含有する形質転換細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】

インスリンは膵臓ランゲルハンス島の β 細胞より分泌され、主に筋肉、肝臓、脂肪に作用して血中の糖を細胞に取り込ませて貯蔵、消費させることにより血糖値を降下させる。糖尿病は、このインスリンの作用不足から引き起こされるが、患者にはインスリンの生産・分泌に障害をもつ1型と、インスリンによる糖代謝促進が起こりにくくなる2型の2つのタイプが存在する。いずれの患者でも血糖値が健常人より高くなるが、1型では血中インスリンが絶対的に不足するのに対して、2型ではインスリンの存在にもかかわらず血糖の細胞における取り込み・消費が促進されないインスリン抵抗性が生じている。2型糖尿病は遺伝的素因に加えて過食や運動不足、ストレスなどが原因となり惹起されるいわゆる生活習慣病で

ある。今日先進諸国では摂取カロリーの増大に伴いこの2型糖尿病患者が急激に増加しており、日本では糖尿病患者の95%を占めている。そのため糖尿病の治療薬には単純な血糖降下剤のみでなく、インスリン抵抗性の改善により糖代謝を促進する2型糖尿病の治療を対象とした研究の必要性が高まっている。

現在1型糖尿病患者の治療にはインスリン注射製剤が処方されている。一方、2型患者に処方される血糖降下剤としては、インスリン注射製剤に加えて膵臓の β 細胞に作用してインスリンの分泌を促すスルホニル尿素系血糖降下剤(SU剤)や、嫌氣的解糖作用による糖利用の増大や糖新生の抑制、及び糖の腸管吸収を抑制する作用を持つビグアナイド系血糖降下剤の他、糖質の消化吸收を遅らせる痾ーグルコシダーゼ阻害剤が知られている。これらは間接的にインスリン抵抗性を改善するが、近年より直接的にインスリン抵抗性を改善する薬剤としてチアゾリジン誘導体が使われるようになった。その作用は細胞内へのブドウ糖の取り込みと細胞内におけるブドウ糖利用の促進である。このチアゾリジン誘導体はペルオキシソーム増殖剤応答性受容体ガンマ(peroxisome proliferator activated receptor:PPAR γ)のアゴニストとして作用することが示されている(非特許文献1参照)。しかしチアゾリジン誘導体はインスリン抵抗性を改善するのみでなく、浮腫を惹起する副作用が知られている(非特許文献2-3参照)。この浮腫の惹起は心肥大をもたらす重篤な副作用なので、インスリン抵抗性改善のために、PPAR γ にかわるより有用な創薬標的分子が求められている。

インスリン作用のシグナルは細胞膜上にあるインスリン受容体を介して細胞内へ伝達される。このインスリンの作用経路には第一と第二の2経路が存在する。(非特許文献4参照)。第一経路においては、活性化されたインスリン受容体からIRS-1及びIRS-2、PI3キナーゼ、PDK1を介してAkt1(PKB α)あるいはAkt2(PKB β)、またはPKC λ あるいはPKC ζ へ順次シグナルが伝達され、その結果として細胞内に存在するグルコーストランスポーターGLUT4を細胞膜上へ移行させることにより、細胞外からの糖の取り込みを促進する。(非特許文献5参照)。一方、第二経路ではインスリン受容体からc-Cbl及びCAPを介してCrK II、C3G、及びTC10へ順次シグナルが伝達され、結果GLUT4による糖の取り込みを促進する(非特許文献6参照)。しかし、これらインスリンシグナル伝達経路の詳細についてはいま

だ不明な部分が多く、特にこれらのシグナルが最終的にどのような機構を経てグルコーストランスポーターを介した細胞の糖取り込みを促進するのか明らかではない。

Akt2は前述のインスリンシグナル第一経路に存在し、インスリンの刺激によりPKIを介してリン酸化され活性化する。活性化したAkt2はキナーゼとして基質となる蛋白質をリン酸化することによりシグナルを伝達する。Akt2蛋白質をコードする遺伝子を人為的に欠失させたホモノックアウトマウスは主に筋肉、肝臓においてインスリンの感受性が低下し2型糖尿病様の表現型を示すことが報告されている。これらの事実から、Akt2はインスリンシグナルに応答した細胞内への糖取り込みに働くシグナル仲介因子であり、その機能阻害はインスリンシグナル伝達の部分的な遮断によりインスリン抵抗性を惹起すると考えられている(非特許文献7参照)。一方、Akt2と直接相互作用してその活性を調節する分子はこれまでに知られていなかった。

【0003】

【非特許文献1】「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」、(米国)、1995年、第270巻、p. 12953-12956

【非特許文献2】「ダイアビーズ フロンティア (Diabetes Frontier)」、(米国)、1999年、第10巻、p. 811-818

【非特許文献3】「ダイアビーズ フロンティア (Diabetes Frontier)」、(米国)、1999年、第10巻、p. 819-824

【非特許文献4】「ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (The Journal of Clinical Investigation)」(米国)、2000年、第106巻、第2号、p. 165-169

【非特許文献5】「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry)」、(米国)、1999年、第274巻、第4号、p. 1865-1868

【非特許文献6】「ネイチャー (Nature)」、(英国)、2001年、第410巻、第6831号、p. 944-948

【非特許文献7】「サイエンス (Science)」(米国)、2002年、第292巻、第2号、p. 1728-1731

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、Akt2蛋白質の作用を制御する分子を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上述の知見からAkt2の働きを増強させることができれば、インスリン抵抗性を改善できると考えた。そしてこの目的は、Akt2自身の活性を増大させるか、Akt2に結合してその作用を制御している細胞内因子を同定し、その作用を調節することにより達成できると考えた。しかしAkt2はキナーゼであり、その酵素活性を薬剤によって増強する方向に調節することは困難である。そこでAkt2に結合する蛋白質を、酵母ツーハイブリッドシステムにより同定した。その結果、Akt2に結合する蛋白質AKBP2 (Akt2 Binding Protein 2) をコードする新規な塩基配列のマウス由来cDNAのクローニングに成功した。さらに同蛋白質は糖尿病モデルマウスの筋肉および脂肪において正常個体より発現量が顕著に増加していることから同蛋白質が糖尿病態の原因因子であることを見出した。加えて、ヒトオルソログであるヒトAKBP2遺伝子のクローニングに成功し、該遺伝子がインスリン応答組織である脂肪細胞に発現していることを見出し、本発明を完成させた。

【0006】

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、Akt2と結合するポリペプチド、あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなり、しかもAkt2と結合するポリペプチド、
- (2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (3) (1) 又は (2) に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- (4) (3) に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

(5) (4) に記載の発現ベクターで形質転換された細胞に関する。

【0007】

Akt2に結合する性質を有し、糖尿病態において発現量が増加する本発明のポリペプチド及びポリヌクレオチドは、糖尿病の診断に有用である。また、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター及び細胞は糖尿病改善薬のスクリーニングに有用である。本発明の遺伝子のアンチセンスオリゴの利用は糖尿病治療への利用が可能である。本発明のポリヌクレオチドを検出できるプローブを利用することにより、糖尿病の診断が可能である。

<本発明のポリペプチド>

本発明のポリペプチドには、

- (1) 配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
 - (2) 配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列を含み、しかもAkt2に結合するポリペプチド、あるいは、配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1～10個(好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個、更に好ましくは1～3個)のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列からなり、しかもAkt2に結合するポリペプチド(以下、機能的等価改変体と称する)；及び
 - (3) 配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、Akt2に結合する蛋白質であるポリペプチド(以下、相同ポリペプチドと称する)；
- が含まれる。

本発明の相同ポリペプチドは、配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、Akt2に結合するポリペプチドである限り、特に限定されるものではないが、配列番号2又は配列番号4で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドが好ましい。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、Clustal program (Higgins and S

harp, Gene 73, 237-244, 1998; Thompson et al. Nucl. Acids Res. 22, 4673-4680, 1994) 検索によりデフォルトで用意されているパラメータを用いて得られた値を意味する。前記のパラメータは以下のとおりである。

Pairwise Alignment Parametersとして

K tuple 1

Gap Penalty 3

Window 5

Diagonals Saved 5

また、本発明のポリペプチドは、前述の (1) ~ (3) のいずれかに該当する限り他の脊椎動物（例えばマウス、ラット、ウサギ、ウマ、ヒツジ、イヌ、サル、ネコ、クマ、ブタ、ニワトリなど）由来のものも包含する。

【0008】

<本発明のポリヌクレオチド>

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチド、すなわち、配列番号2又は配列番号4に記載のアミノ酸配列で表されるポリペプチド、その機能的等価改変体、または、その相同ポリペプチドをコードする塩基配列ならいずれの種由来のものであってもよい。好ましくは、配列番号2又は配列番号4に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号1又は配列番号3に記載の塩基配列である。なお、本明細書における「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAの両方が含まれる。

【0009】

本発明のポリヌクレオチドには、本発明のポリペプチドをコードする限り、あらゆる変異体を含むことが出来る。より具体的には天然に存在するアレル変異体、天然に存在しない変異体、欠失、置換、付加及び挿入を有する変異体を含むことが出来る。前記の変異は、例えば天然において突然変異によって生じることもあるが、人為的に改変・作製することも出来る。本発明は、上記ポリヌクレオチドの変異の原因及び手段を問わず、上記本発明のポリペプチドをコードする全ての変異遺伝子を包含する。上記の変異体作製にいたる人為的手段としては、例えば塩基特異的置換法(Methods in Enzymology、(1987)154、350、367-382)等の遺伝

子工学的手法の他、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイド法などの化学合成手段(Science、150,178、1968)を挙げることができる。それらの組み合わせによって所望の塩基置換を伴うDNAを得ることが可能である。あるいはPCR法の繰り返し作業や、その反応液中にマンガニオンなどを存在させることによりDNA分子中の非特定塩基に置換を生じさせることが可能である。

【0010】

本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドは、本発明により開示された配列情報に基づいて一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することが出来る。

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、例えば次のように得ることができるが、この方法に限らず公知の操作「Molecular Cloning」[Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年]でも得ることができる。

例えば、(1) PCRを用いた方法、(2) 常法の遺伝子工学的手法(すなわちcDNAライブラリーで形質転換した形質転換株から所望のアミノ酸を含む形質転換株を選択する方法)を用いる方法、又は(3) 化学合成法などを挙げることができる。各製造方法については、W001/34785に記載されているのと同様に実施できる。

PCRを用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法a)第1製造法に記載された手順により、本明細書記載のポリヌクレオチドを製造することができる。該記載において、「本発明の蛋白質を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織」とは、例えば、ヒト骨格筋を挙げることができる。ヒト骨格筋からmRNAを抽出する。次いで、このmRNAをランダムプライマーまたはオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い、第一鎖cDNAを合成することが出来る。得られた第一鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に供し、本発明のポリヌクレオチドまたはその一部を得ることができる。より具体的には、例えば実施例1に記載の方法により本発明のポリヌクレオチドを製造することが出来る。

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法b) 第2製造法に記載された手順により、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを製造することができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋白質遺伝子の製造方法c) 第3製造法、d) 第4製造法に記載された方法によって、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを製造することができる。

【0011】

このようにして得られる本発明のポリヌクレオチドの一部または全部の塩基配列を利用することにより、個体もしくは各種組織における本発明のポリヌクレオチドの発現レベルを特異的に検出することが出来る。

かかる検出方法としては、RT-PCR (Reverse transcribed-Polymerase chain reaction)、ノーザンブロッティング解析、in situ ハイブリダイゼーションなどの方法を挙げることが出来る。RT-PCRによって本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出する場合に用いられるプライマーは、該ポリヌクレオチドのみを特異的に増幅できるものである限り特に制限は無く、本発明のポリヌクレオチドの配列情報に基づいて適宜設定することが出来る。本発明のポリヌクレオチドを特異的に増幅するプライマーは、本発明のポリヌクレオチドを検出するための特異プライマー及び特異プローブとして利用できる。

【0012】

<本発明の発現ベクター及び細胞>

上述のように得られた本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、「Molecular Cloning」[Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年]等に記載の方法により、適当なプロモーターの下流に連結することで本発明のポリペプチドを試験管内、あるいは試験細胞内で発現させることに利用できる。

具体的には上述のように得られた本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの5'側にある本発明のポリペプチドの開始コドン上流に特定のプロモ-

ター配列を含むポリヌクレオチドを付加することにより、これを鋳型として用いた無細胞系での遺伝子の転写、翻訳による本発明のポリペプチドの発現が可能である。

あるいは上述の本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを適当なベクタープラスミドに組み込み、プラスミドの形で宿主細胞に導入すれば細胞内で本発明のポリペプチドの発現が可能になる。あるいは、このような構成が染色体DNAに組み込まれた細胞を取得してこれを用いてもよい。より具体的には、単離されたポリヌクレオチドを含む断片は、適当なベクタープラスミドに再び組込むことにより、真核生物及び原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において本発明のポリペプチドを発現させることが可能である。宿主細胞は、特に限定されるわけではなく、本発明のポリペプチドの発現量をメッセンジャーRNAレベルで、あるいは蛋白質レベルで検出できるものであればよい。内在性のAkt2が豊富に存在する脂肪由来細胞、あるいは筋肉由来細胞を宿主細胞として用いることがより好ましい。

宿主細胞を形質転換し遺伝子を発現させる方法は、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組換え蛋白質の製造方法に記載された方法により実施できる。発現ベクターは、所望のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではない。例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、所望のポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。本発明の細胞は、例えば、前記発現ベクターにより所望の宿主細胞をトランスフェクションすることにより得ることができる。より具体的には、例えば、実施例2に記載のように所望のポリヌクレオチドを哺乳類動物細胞用の発現ベクターpcDNA3.1に組み込むことにより、所望の蛋白質の発現ベクターを得ることができ、該発現ベクターをリン酸カルシウム法を用いて293細胞に取り込ませて本発明の形質転換細胞を製造することができる。

上記で得られる所望の形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により所望の蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した

宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択できる。例えば上記293細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修飾イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地にG418を加えたものを使用できる。

【0013】

本発明の細胞を培養することにより、細胞中で産生した本発明のポリペプチドを検出、定量、さらには精製することが出来る。例えば、本発明のポリペプチドと結合する抗体を用いたウエスタンブロット法、あるいは免疫沈降法により本発明のポリペプチドを検出、精製することが可能である。あるいは、本発明のポリペプチドを、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、プロテインA、 β -ガラクトシダーゼ、マルトースーバインディングプロテイン(MBP)など適当なタグ蛋白質との融合蛋白質として発現させることにより、これらタグ蛋白質に特異的な抗体を用いてウエスタンブロット法、あるいは免疫沈降法により本発明のポリペプチドを検出、タグ蛋白質を利用して精製することが出来る。あるいは所望により、該蛋白質の物理的性質、化学的性質を利用した各種の分離操作によっても精製できる。具体的には限外濾過、遠心分離、ゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーの利用を例示することが出来る。

【0014】

本発明のポリペプチドは、配列番号2又は配列番号4に示すアミノ酸配列情報に従って、一般的な化学合成法により製造することが出来る。具体的には液相、及び固相法によるペプチド合成法が包含される。合成はアミノ酸を1個ずつ逐次結合させても、数アミノ酸からなるペプチド断片を合成した後に結合させてもよい。これらの手段により得られる本発明ポリペプチドは前記した各種の方法に従って精製を行うことが出来る。

【0015】

<糖尿病の検査方法>

本発明のポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするプローブを用いることにより、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現量を調べるために用いることができ、その発現量(好ましくは脂肪組織

における発現量)の増加を指標として糖尿病の診断をすることができる。本明細書において、「ストリンジェントな条件」とは、非特異的な結合が起こらない条件を意味し、具体的には、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含有する0.1×SC(Saline-sodium citrate buffer)溶液を使用し、温度が65℃である条件を意味する。プローブとしては、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部若しくは全部の配列(またはその相補配列)を有し、少なくとも15bpの鎖長のDNAが用いられる。

糖尿病の検出方法では、上述のプローブと試験試料とを接触させ、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(例えば、mRNA又はそれ由来のcDNA)と前記プローブとの結合体を、公知の分析方法(例えば、ノザンブロッティング)で分析することにより、糖尿病であるか否かを検出することができる。また、上述のプローブをDNAチップに適用し、発現量を分析することもできる。前記結合体の量、すなわち、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの量が、健常人に比べて増加している場合には、糖尿病であると判定することができる。

AKBP2の発現レベルを測定する方法として、発現レベルを本発明のポリペプチドの検出によって測定する方法が可能である。このような検査方法としては、例えば、試験試料を本発明のポリペプチドに結合する抗体、好ましくは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を利用したウエスタンブロッティング、免疫沈降法、ELISA法などを利用することが出来る。試験試料中に含まれる本発明のポリペプチドの量を定量する際、本発明のポリペプチドを標準量として利用することができる。本発明のポリペプチドの量が健常人に比べて増加している場合には、糖尿病であると判定することができる。

【0016】

<アンチセンスDNA及びウイルスベクター>

後述の実施例3及び4に示すように配列番号1及び3で表される本発明のポリヌクレオチドは脂肪細胞組織において発現が認められる。よって本発明のポリペプチドをコードするDNAのアンチセンスDNAの全部または一部を包含する任意の遺伝子発現ベクターあるいは化学的修飾により安定化したアンチセンスDNA断片そのもの

を脂肪細胞組織で作動させることにより本発明のポリヌクレオチドの翻訳を阻害し、強制的に本発明のポリペプチドの発現を抑制することが出来る。これにより脂肪におけるAkt2の活性を調節してインスリンシグナル第一経路を介した糖取り込みを制御することが可能となり、結果として糖代謝を制御できる。

また本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの全部または一部を包含する任意のウイルスベクターを作製し、該ウイルスを脂肪細胞組織に感染させて作動させることにより、細胞内で本発明のポリヌクレオチドの発現を強制的に亢進させ、本発明のポリペプチド量を増大させることができる。これにより脂肪細胞におけるAkt2の活性を調節し、インスリンシグナル第一経路を介した糖取り込みを制御することが可能となり、結果として糖代謝を制御できる。

【0017】

アンチセンスDNAは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp以上、さらに好ましくは500bp以上の鎖長を有し、通常、3000bp以内、好ましくは2000bp以内の鎖長を有する。

化学的修飾により安定化したアンチセンスDNA断片は、例えば本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号1又は配列番号3に記載のDNA）の配列情報を基にホスホロチオネート法（Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res. 16, 3209-21 (1988)）により作製することができる。上述のアンチセンスDNAの脂肪細胞への導入方法としてはリン酸カルシウム法、リポソーム法などを挙げることが出来る。

上述のアンチセンスDNAあるいはウイルスベクター利用において、脂肪細胞における強制発現の具体的な方法としては、例えばaP2プロモーターの利用を例示できる。

上述のウイルスベクターの具体例としては、レトロウイルスベクター（McLachlin J R(1994) Proc.Natl.Acad.Sci.,USA., 91, 6186-6196）、アデノウイルスベクター（Tong-Chuan He(1998) Proc.Natl.Acad.Sci.,USA., 95, 2509-2514）の利用を例示できる。

本発明によれば、本発明のポリヌクレオチド発現用のウイルスベクターを有効成

分として含有する医薬、とくに糖代謝を改善するために使用される当該医薬が提供される。

【0018】

＜インスリン抵抗性改善薬及び糖代謝改善薬のスクリーニング方法＞

本発明のポリペプチドを使用し、本発明のポリペプチドとAkt2キナーゼとの相互作用を利用して、Akt2活性の変化を指標とすることからなるインスリン抵抗性改善作用を有する物質及び糖代謝改善作用を有する物質（即ち糖尿病改善薬）のスクリーニング方法を構築できる。

上記スクリーニング方法の一つの実施態様としては、本発明のポリペプチドの一部あるいは全長域を発現させた試験用細胞を用い、これを被験物質と共存させ、試験用細胞における被験物質によるAkt2の量的変化、Akt2の分子内リン酸化または活性の変化を指標とすることからなるインスリン抵抗性改善作用を有する物質及び糖代謝改善作用を有する物質のスクリーニング方法が挙げられる。具体的には、Akt2の発現量変化は、Akt2を特異的に増幅できるプライマーセットを用いたリアルタイムPCR法あるいはAkt2タンパクを特異的に認識する抗体を用いたウエスタンブロット法により測定することができる。また、酵素活性は、Akt2の免疫沈降物と、ヒストンH2BやGSK-3融合タンパク質などの基質を反応させたときの、基質に対する放射性リン酸の取り込み量を測定するインビトロキナーゼアッセイ法や、酵素活性を調節しているセリン473番あるいはスレオニン308番のリン酸化状態を、これらリン酸化残基に特異的に反応する抗体を用いたウエスタンブロット法により測定することができる。

該スクリーニングにおいて、Akt2の量、Akt2の分子内リン酸化または活性を亢進する物質をインスリン抵抗性改善薬及び糖代謝改善薬即ち糖尿病治療効果を有する物質として選択することができる。

本発明のスクリーニング法で使用する被検物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、市販の化合物（ペプチドを含む）、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術(N.Terrett et al., Drug Discov. Today, 4(1):41, 1999)によって得られた化合物群、微生物の培養上清、植物や海洋生物由来の天然成分、動物組織

抽出物、あるいは、本発明のスクリーニング法により選択された化合物（ペプチドを含む）を化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を挙げることができる。

【0019】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法（「Molecular Cloning」 Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年、等）に従って実施可能である。また、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って実施可能である。

【0020】

<実施例1>マウスAKBP2遺伝子のクローニングと発現ベクターの構築

(1) Akt2遺伝子のクローニング

遺伝子データベースGenbankのアクセッション番号M95936に記載されたヒトAkt2の全長領域をコードするcDNA配列を参照して設計した配列番号5及び配列番号6で示されるオリゴヌクレオチドをプライマーとし、ヒト骨格筋cDNA (Marathon-ReadyTM cDNA; クロンテック社) を鋳型として、DNAポリメラーゼ (Pyrobest DNA Polymerase (宝酒造社)) を用いて、95℃3分間の熱変性反応の後、98℃10秒間、60℃30秒間、74℃1分30秒からなるサイクルを40回、さらに74℃7分間の条件で、PCRを行なった。これにより生成した約1.5 kbpのDNA断片を、プラスミドpZER0TM-2.1 (インビトロジェン社) のEcoRV認識部位に挿入することにより、ヒトAkt2 cDNAをクローニングした。ベクター上にクローニングしたAkt2 cDNAの配列は前述の配列番号5及び配列番号6に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとして、シーケンシングキット (アプライドバイオシステム社) 及びシーケンサー (ABI 3700 DNA sequencer アプライドバイオシステムズ社) を用いて塩基配列を決定し、報告された配列と一致することを確認した。

(2) 酵母ツーハイブリッド用発現プラスミドの作製

ヒトAkt2のcDNAを酵母ツーハイブリッド用発現ベクターpDBtrp (インビトロジェン社) に挿入するため、ヒトAkt2遺伝子配列のそれぞれ5'側及び3'側にpDBtrpベ

クターのマルチクローニングサイトの前後40ヌクレオチドと相同な領域を付加した配列番号7及び配列番号8に示すプライマーを設計した。PCRは上述でクローニングしたマウスAkt2プラスミドを鋳型として、DNAポリメラーゼ (Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社) を用い、98℃(1分)の後、98℃(5秒)、55℃(30秒)、72℃(5分)のサイクルを35回、繰り返した。その結果得られたDNA断片はヒトAkt2遺伝子の全コード領域を有している。

制限酵素SalI及びNcoIで切断して直鎖状にしたベクターpDBtrp及び上記で得られたマウスAkt2のcDNAを含むPCR断片を同時にツーハイブリッド用酵母株MaV203 (インビトロジェン社) へ添加し、リチウム酢酸法により形質転換した(Guthrie C. and Fink R., Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Academic, San Diego, 1991年)。その結果同酵母細胞内で相同組換えが生じ、pDBtrpのマルチクローニングサイトにAkt2 cDNAが挿入されたプラスミド (以下pDB-Akt2と略称する) が形成された。同プラスミドを有する酵母細胞を、プラスミドの選択マーカーであるトリプトファンを欠乏させた固形合成最小培地 (DIFCO社) (20% アガロース) 上にて培養することにより選択し、同酵母細胞をザイモリエース (生化学工業社) で37℃にて30分処理した後、アルカリ法でプラスミドを単離精製し、シーケンシングキット (アプライドバイオシステム社) 及びシーケンサー (ABI 3700 DNA sequencer アプライドバイオシステムズ社) を用いて塩基配列の決定を行い、Akt2のcDNAが、pDBtrpのGAL4 DNA結合領域のコード領域と翻訳フレームが一致して挿入されているものを選択した。

(3) マウス脂肪組織由来cDNAライブラリーの作製

12週令オスのC57BL/6Jマウス、及び13週令オスのC57BL/KsJ-⁺m/⁺mマウスを日本クレアより購入し、副睾丸脂肪から実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ2 遺伝子ライブラリー作製法 (羊土社 野島博 編集; 1994年2月20日発行) に記載のmRNA調製法に従い、Poly(A)⁺RNAを調製した。ストラタジーン社のZAP-cDNA Synthesis Kitを用いて、添付のプロトコールに従い、5 µgのRNAを用いて第1ストランド合成、第2ストランド合成を行い、2本鎖cDNAを平滑末端化し、キットに添付のEcoRIアダプターを連結し、制限酵素EcoRI、及びXhoIで切断した。スピニングラム (CHROMA SPIN-400; クロンテック社) によりサイズ分画を行い、短い断片

を除いた。ベクターpACT2 (クロンテック社) 100 μ g を制限酵素XhoIで切断し、アルカリフォスファターゼ (Bacterial Alkaline Phosphatase; 宝酒造社) で処理した後、制限酵素EcoRIで切断し、スピンカラム (CHROMA SPIN-1000; クロンテック社) にかけた。実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ2 遺伝子ライブラリー作製法 (羊土社 野島博 編集; 1994年2月20日発行) のcDNAライブラリー作製法に従い、ベクターとcDNAを連結し、連結後のサンプルをミリポア社のフィルターカップ (UFCP3TK50) で処理した。ギブコBRL社のエレクトロポレーション用大腸菌 (ElectroMAXTM DH10BTM Cells) を用いて、エレクトロポレーション法による形質転換を行い、1000mlの培養液で一晩振盪培養した。培養液中に独立コロニーが 10^6 個以上であることを確認し、プラスミド精製キット (Qiagen Plasmid Kit; キアゲン社) を用いて、キットに添付のプロトコールに従い、プラスミドを精製した。

(4) 酵母ツーハイブリッドスクリーニング

上述のpDB-Akt2により形質転換したツーハイブリッド用酵母株MaV203を400mlのYPD液体培地 (DIFCO社) に懸濁し、波長590ナノメートルの吸光度が0.1から0.4になるまで30℃で約6時間振とう培養した後、リチウム酢酸法でコンピテントセルとし、最終量を1.0mlの0.1M リチウム-トリス緩衝液に懸濁した。同細胞を前述(3)で作製したマウス脂肪組織由来cDNAライブラリー各20 μ g で形質転換し、同細胞をpDB-Akt2及びライブラリーそれぞれのプラスミドの選択マーカーであるトリプトファン、ロイシンを欠乏させた固形合成最小培地 (DIFCO社) (20%アガロース) 上にて培養することにより選別し、両プラスミドが導入された形質転換株を得た。同時に同じ形質転換細胞をトリプトファン、ロイシンのほかに、ツーハイブリッドシステムにおいて人工的に発現させたGAL4 DNA 結合領域の融合蛋白質に、GAL4 転写促進領域の融合蛋白質が結合した場合に発現するレポーター遺伝子HIS3が作動した細胞を選択するため、ヒスチジンを培地から除き、さらにHIS3がコードする酵素の阻害剤である3AT(3-AMINO-1,2,4-TRIAZOLE; シグマ社)20mMを添加した固形最小培地 (20%アガロース) 上で30℃にて5日間培養した。同条件下でAkt2に結合する蛋白質を発現していることを示す3AT耐性の酵母のコロニーを取得した。これらの酵母細胞を24時間YPD固形培地上で成長させた後、HIS3

とは別のツーハイブリッド システムの結合指示レポーターである lacZ 遺伝子の発現を β -ガラクトシダーゼ活性を指標として調べた。 β -ガラクトシダーゼ活性は培地上の酵母細胞をニトロセルロースフィルターに移し取り、液体窒素中で凍結させた後、室温で解凍し、フィルターを 0.4% の X-GAL (シグマ社) 溶液を浸した濾紙上にのせて 37℃ で 24 時間静置し、 β -ガラクトシダーゼによる青色変化を測定した。フィルター上に写し取った細胞内容物が白色から青色に変化したコロニーを選択することにより、Akt2 に結合する蛋白質を発現している酵母細胞を特定し、同細胞からクロンテック社 Yeast Protocols Handbook の方法に従ってライブラリー由来のプラスミドを抽出した。そこに含まれる遺伝子断片の塩基配列を、配列番号 9 で表される塩基配列 (GAL4 AD 領域に結合する配列; GenBank アクセス番号 U29899 Cloning vector pACT2 由来) をプライマーとし、シーケンシングキット (アプライドバイオシステム社) 及びシーケンサー (ABI 3700 DNA sequencer アプライドバイオシステムズ社) を用いて決定した結果、配列番号 1 に示す塩基配列が含まれていることを確認した。

(5) マウス AKBP2 遺伝子の開始コドンの決定

前述 (4) の結果、配列番号 1 で表される塩基配列を含む遺伝子断片を持ったライブラリー由来のプラスミドが得られた。そこで該断片に含まれる遺伝子の開始コドンを決めるために、配列番号 1 で示された塩基配列の第 1034 番目から第 1011 番目の塩基配列の相補鎖に相当する配列番号 10 で表される塩基配列のプライマーを合成 (プロリゴ社) し、該プライマーと前述配列番号 9 で表される塩基配列のプライマーを用いて前述の脂肪組織由来 cDNA ライブラリー中から PCR 法により該遺伝子の発現産物由来の全長 cDNA の増幅を試みた。PCR 反応は DNA ポリメラーゼ (TA KARA LA Taq; 宝酒造社) を用い、94℃ (3 分) の後、94℃ (30 秒) ・ 58℃ (1.5 分) ・ 72℃ (4 分) のサイクルを 35 回繰り返した。反応液中の同 DNA 断片を発現ベクター (pcDNA3.1/V5-His-TOPO; インビトロジェン社) に TOPO TA Cloning システム (インビトロジェン社) を用いてクローニングした。得られたプラスミド中の挿入 DNA 断片の塩基配列を、ベクター上の T7 プロモーター領域に結合するプライマー (TOPO TA Cloning kit; インビトロジェン社; 配列番号 11) とシーケンシングキット (アプライドバイオシステム社) 及びシーケンサー (ABI 3700 DNA sequencer

；アプライドバイオシステムズ社)を用いて決定した。その結果、該遺伝子の配列を有する様々な長さのcDNAを含むプラスミドが得られたが、最長のcDNAはいずれも前述(4)で得られた転写産物由来のcDNAとほぼ同等の鎖長であった。数度の試行でも同じ結果であったことから、該遺伝子の転写産物の鎖長および配列は(4)で得られたcDNAとほぼ一致すると推定された。これにより配列番号1に示す塩基配列の初めにあるATGが該遺伝子の開始コドンであると推定され、配列番号1に示す該遺伝子のオープンリーディングフレームを確定した。この遺伝子をマウスAKBP2遺伝子と名付けた。

(6) マウスAKBP2発現ベクターの作製

前述(4)の結果、配列番号1で表される塩基配列の全長を含む遺伝子断片を持ったライブラリー由来のプラスミドが得られ、Akt2に結合する因子の存在が示された。また前述(5)においてそのオープンリーディングフレームが確定した。そこで配列番号1に示す塩基配列情報に従い、配列番号12及び配列番号13に示すプライマーを合成(プロリゴ社)し、該プライマーを用いて、正味AKBP2蛋白質をコードするAKBP2 cDNAを前述の(4)で得られたプラスミドを鋳型としてPCR法により増幅した。これら2種類のDNAプライマーはそれぞれ配列番号1が示すマウスAKBP2遺伝子の5'側、3'側の部分配列と相同な塩基配列を有する。PCR反応はDNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA Polymerase; 宝酒造社)を用い、98℃(1分)の後、98℃(5秒)、55℃(30秒)、72℃(5分)のサイクルを35回繰り返した。PCR産物をアガロースゲル電気泳動によって分離した結果、約1.7kbpのDNA断片が増幅されたことを確認した。そこで反応液中の同DNA断片を発現ベクター(pcDNA3.1/V5-His-TOPO; インビトロジェン社)にTOPO TA Cloning システム(インビトロジェン社)を用いてサブクローニングした。このとき用いた配列番号13に示すプライマーはクローニング後3'側にベクター由来のV5エピトープ(paramyxovirus SV5のV protein由来、Southern J A, J. Gen. Virol. 72, 1551-1557, 1991)及びHIS6タグ(Lindner P BioTechniques 22, 140-149, 1997)がマウスAKBP2遺伝子のトリプレットと同じフレームで続くように、AKBP2のストップコドン配列が除かれるよう設計した。得られたプラスミド中の挿入DNA断片の塩基配列を、ベクター上のT7プロモーター領域に結合するプライマー(TOPO TA Cloning kit; インビトロジェン社; 配列番

号11) とシーケンシングキット (アプライドバイオシステム社) 及びシーケンサー (ABI 3700 DNA sequencer; アプライドバイオシステムズ社) を用いて決定した。その結果、配列番号1に示す正味AKBP2蛋白質をコードする1719塩基対のAKBP2 cDNAがDNA配列の・'側のストップコドンを除いたDNAとして前述の発現ベクターp cDNA3.1/V5-His-TOPOに挿入されていることを確認した。以下この発現プラスミドをpcDNA-AKBP2と略記する。

【0021】

<実施例2> AKBP2蛋白質を発現する培養細胞の作製

(1) AKBP2発現細胞の作製

上述の実施例1(5)で作製した発現プラスミドpcDNA-AKBP2又は空ベクター (pcDNA 3.1/V5-His-TOPO) を293細胞 (インビトロジェン社) に導入した。293細胞は6ウェル培養プレート (ウェル直径35mm) の培養皿に各ウェル2mlの10%牛胎児血清 (シグマ社) を含む最少必須培地DMEM (ギブコ社) を加えて70%コンフルエントの状態になるまで培養した。この細胞にリン酸カルシウム法 (Graham et al., Virology, 52, 456, 1973、新井直子、遺伝子導入と発現/解析法13-15頁1994年) によりpcDNA-AKBP2 (3.0 μ g/ウェル) を一過性に導入した。30時間培養した後、培地を除去し、細胞をリン酸緩衝液 (以下PBSと略称する) で洗浄した後にウェルあたり0.1 mlの細胞溶解液 (100mM リン酸カリウム (pH7.8)、0.2%トリトンX-100) を添加して細胞を溶解した。

(2) AKBP2蛋白質の検出

上述実施例2(1)のAKBP2発現細胞の溶解液10 μ lに10 μ lの2倍濃度SDSサンプルバッファー (125mM トリス塩酸 (pH6.8)、3%ラウレル硫酸ナトリウム、20% グリセリン、0.14M β -メルカプトエタノール、0.02%ブロムフェノールブルー) を添加し、100℃で2分間処理した後、10%のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、試料中に含まれている蛋白質を分離した。セミドライ式プロッティング装置 (バイオラッド社) を用いてポリアクリルアミド中の蛋白質をニトロセルロース膜に転写した後、常法に従いウエスタンプロッティング法により該ニトロセルロース上のAKBP2蛋白質の検出を行った。一次抗体にはAKBP2のC末端に融合させたV5エピトープを認識するモノクローナル抗体 (インビトロジェン社) を用い、二次抗

体にはラビットIgG-HRP融合抗体（バイオラッド社）を用いた。その結果、図1に示す通り、45アミノ酸からなるC末端側のタグを含む618アミノ酸からなるAKBP2-V3-HIS6融合蛋白質を示す約70kDaの蛋白質が発現ベクターpcDNA-AKBP2の細胞導入に依存して検出されることを確認した。これにより、培養細胞中でクローニングした前述のマウスAKBP2遺伝子は全長領域が確かに発現し、蛋白質として安定な構造をとりうる事が明らかになった。

【0022】

<実施例3>正常マウス、高脂肪食負荷正常マウス、および糖尿病モデルマウスにおけるAKBP2発現量の測定

上述の知見により本発明のマウスAKBP2蛋白質はAkt2と結合し、脂肪、筋肉などのインスリン応答組織で発現していることが判明した。Akt2蛋白質はインスリンシグナル第一経路に作用する因子であることから、本発明のAKBP2の作用がインスリン抵抗性に関わることが予想された。そこで2型糖尿病モデルマウスKKAY /Ta (Iwatsuka et al. Endocrinol. Japon.: 17, 23-35, 1970、Taketomi et al., Horm. Metab. Res., 7, 242-246, 1975) および通常食もしくは高脂肪食を与えた健常マウスC57BL/6Jの筋肉および脂肪におけるAKBP2遺伝子のメッセンジャーRNA(mRNA)発現量を測定した。

遺伝子発現量は、本発明のマウスAKBP2遺伝子の発現量を測定し、同時に測定したグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)) 遺伝子の発現量により補正した。測定系としてはPRISM™ 7700 Sequence Detection SystemとSYBR Green PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社)を用いた。本測定系においてはPCRで増幅された2本鎖DNAがとりこむSYBR Green I色素の蛍光量をリアルタイムに検出・定量することにより、目的とする遺伝子の発現量が決定される。

具体的には、以下の手順により測定した。

(1) 全RNA(totalRNA)の調製

通常食又は高脂肪食負荷した14週齢のオスのC57BL/6Jマウス、並びに15週齢のオスのC57BL/6Jマウス及びKKAY /Taマウス (いずれも日本クレア社)を使用した。高脂肪食負荷は5週齢から14週齢までの9週間行った。高脂肪食の組成は次の通り

である；カゼイン29.8%、スクロース15.8%、ビタミンミックス1.3%、ミネラルミックス8.8%、セルロースパウダー5.0%、メチオニン0.5%、サフラワーオイル28.9%、水10%。一方、正常食はCE-2（日本クレア社）を用いた。前記各マウスの筋肉および脂肪を摘出し、RNA抽出用試薬（Isogen；ニッポンジーン社）を用いて、説明書に従い全RNAを調製した。調製した各々の全RNAはその後デオキシリボヌクレアーゼ（ニッポンジーン社）を用いて処理し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿して滅菌水に溶解し-20℃で保存した。

（2）1本鎖cDNAの合成

全RNAから1本鎖cDNAへの逆転写は、（1）で調製した $1\mu\text{g}$ のRNA（脂肪）、 $1\mu\text{g}$ のRNA（14週齢のマウスの筋肉） $0.25\mu\text{g}$ のRNA（15週齢のマウスの筋肉）をそれぞれ用い、逆転写反应用キット（AdvantageTM RT-for-PCR Kit；クロンテック社）を用いて $20\mu\text{l}$ の系で行った。逆転写後、滅菌水 $180\mu\text{l}$ を加えて-20℃で保存した。

（3）PCRプライマーの作製

4つのオリゴヌクレオチド（配列番号14-配列番号17）を（4）の項で述べるPCRのプライマーとして設計した。マウスAKBP2遺伝子に対しては配列番号14と配列番号15の組合せ、G3PDH遺伝子に対しては配列番号16と配列番号17の組み合わせで使用した。

（4）遺伝子発現量の測定

PRISMTM 7700 Sequence Detection SystemによるPCR増幅のリアルタイム測定は $25\mu\text{l}$ の系で説明書に従って行った。各系において1本鎖cDNAは $5\mu\text{l}$ 、2xSYBR Green試薬を $12.5\mu\text{l}$ 、各プライマーは 7.5pmol 使用した。ここで1本鎖cDNAは（2）で保存したものをG3PDHに関しては30倍希釈、マウスAKBP2に関しては10倍希釈して使用した。なお検量線作成には、1本鎖cDNAに代えて $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のマウスゲノムDNA（クロンテック社）を適当に希釈したものを $5\mu\text{l}$ 用いた。PCRは、50℃で10分続いて95℃で10分の後、95℃で15秒、60℃で60秒の2ステップからなる工程を45サイクル繰り返すことにより行った。

各試料におけるマウスAKBP2遺伝子の発現量は、下記式に基づいてG3PDH遺伝子の発現量で補正した。

$$[\text{AKBP2補正発現量}] = [\text{AKBP2遺伝子の発現量 (生データ)}] / [\text{G3PDH遺伝子の発現量 (生データ)}]$$

脂肪における発現量の比較においては通常食のC57BL/6Jマウスの発現量を、筋肉組織における発現量の比較においてはC57BL/6Jマウスの発現量を、それぞれ1とした相対量を図2に示した。

図2に示す通り、本発明のマウスAKBP2遺伝子の発現は、高脂肪食負荷時の脂肪において顕著に増加していることが判明した。また糖尿病モデルマウスの筋肉及び脂肪においても発現が顕著に増加していることが判明した。従って本発明のマウスAKBP2は筋肉および脂肪における発現量亢進によりインスリン抵抗性を惹起すると考えられる。以上のことからインスリン抵抗性に本発明のマウスAKBP2の関与が大きいと結論づけられる。

また本実施例の結果より、マウスAKBP2発現量の測定により糖尿病病態の診断が出来ることが明らかとなった。

【0023】

<実施例4> ヒトAKBP2遺伝子のクローニング、および組織別発現分布解析
ヒト脂肪由来cDNAライブラリー（クロンテック社）を鋳型とし、配列番号18及び配列番号19に示す一対のプライマーを用いて、前述の実施例1(5)に示したものと同様のPCR法により、AKBP2ヒトオルソログ遺伝子全長cDNAの増幅を試みた。その結果得られた約1.8kbpのDNA断片を、実施例1に示したものと同様の方法に従い塩基配列を決定したところ、配列番号3に示す遺伝子の全長cDNAが含まれることを確認した。該遺伝子cDNAは配列番号4に示すポリペプチドをコードする新規の遺伝子である。該遺伝子は配列番号1に示すマウスAKBP2遺伝子と76.8%、コードするポリペプチドは配列番号2に示すマウスAKBP2蛋白質と71.3%の相同性をそれぞれ有しているAKBP2のヒトオルソログ遺伝子である。

そこで次に該ヒトAKBP2遺伝子の配列をもとに、配列番号20に示すプライマーを設計し、これと前述配列番号19に示すプライマーを用いて、ヒトAKBP2遺伝子の3'末端側約800塩基のcDNA断片を、ヒト各種組織由来cDNAからPCR反応を用いて増幅を試み、各種組織におけるAKBP2の発現の有無を調べた。ヒトの各種組織cDNAライブラリー（クロンテック社）各2μgを鋳型としてPCR反応はDNAポリメラーゼ

(Pyrobest DNA Polymerase ; 宝酒造社)) を用い、98℃(1分)の後、98℃(5秒)、55℃(30秒)、72℃(5分)のサイクルを35回繰り返した。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動によって分離した結果、骨格筋、肝臓、脂肪由来の各cDNAライブラリーから所望するヒトAKBP2遺伝子の3'末端側部分配列を含むと思われる約800塩基対のDNA断片が増幅された。これらのDNA断片を各々アガロースゲル中から分離した後、上述の実施例 1 (4) に記した方法に従い配列番号20に示すプライマーを用いて該DNA断片の塩基配列をそれぞれ決定した結果、配列番号3に示すヒトAKBP2遺伝子の3'末端側の部分配列であることを確認した。このことから、ヒトAKBP2遺伝子の発現は、インスリンシグナルに応答する脂肪、筋肉、肝臓などの限定された臓器で特異的に制御されていることが判明した。

本実施例の結果、ヒトAKBP2はマウスAKBP2と相同性が高く、さらにインスリン応答性組織で発現が観察されることから、マウスと同様の機能を有しており、糖尿病診断、糖尿病改善薬のスクリーニングに有用であることが明らかになった。

【0024】

【発明の効果】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドは糖尿病の診断に有用である。また、AKBP2はインスリンシグナルに関わる新たな新規分子であり、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、発現ベクター及び細胞は、インスリン抵抗性改善薬並びに糖尿病改善薬の同定及びスクリーニングに用いることが出来る。

【0025】

【配列表フリーテキスト】

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号5～20の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。配列番号9の配列で表される塩基配列は、クローニングベクターpACT2 (GenBank U29899) の第5183番目 (5') ～第5162番目 (3') の塩基からなる配列である。

【0026】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd

<120> Akt2 interacting protein

<130> 3215IPY

<160> 20

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 1722

<212> DNA

<213> Mus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1719)

<223> Inventor: Endo, Yuki; Endoh, Hideki; Ueda, Yoshitaka; Kato, Miyuki; Inabe, Kazunori

<400> 1

atg gca gct gtg ccg ccc ctg cgg gac cgc ttg agc ttc ttg cat agg	48
Met Ala Ala Val Pro Pro Leu Arg Asp Arg Leu Ser Phe Leu His Arg	
1 5 10 15	

ctc ccc atc ctg ttg aag ggg acc tca gat gat agc atc cca tgt cca	96
-----------------------------------------------------------------	----

Leu Pro Ile Leu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Asp Ser Ile Pro Cys Pro
20 25 30

ggc tac ctg ttt gaa gag atc gcc aag att tcc cac gag tca cta ggc 144
Gly Tyr Leu Phe Glu Glu Ile Ala Lys Ile Ser His Glu Ser Leu Gly
35 40 45

agc agc cag tgc ctg ctg gag tac ctc ctg aac cgt ctg gac agc agc 192
Ser Ser Gln Cys Leu Leu Glu Tyr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Ser Ser
50 55 60

tcc ggc cac gtg aag ctc aag gtg cta aag atc ttg ctt tac ctg tgt 240
Ser Gly His Val Lys Leu Lys Val Leu Lys Ile Leu Leu Tyr Leu Cys
65 70 75 80

ggt cat ggc tct tcc tcc ttc ctc ctc atc ctc agg aga aac tct gct 288
Gly His Gly Ser Ser Ser Phe Leu Leu Ile Leu Arg Arg Asn Ser Ala
85 90 95

ctc atc caa gaa gcc acg gct ttc tca ggg cct cca gat cct ctt cac 336
Leu Ile Gln Glu Ala Thr Ala Phe Ser Gly Pro Pro Asp Pro Leu His
100 105 110

gga aat agc ttg tac cag aag gtg cgg gcg gct gcc cag gac ctg ggt 384
Gly Asn Ser Leu Tyr Gln Lys Val Arg Ala Ala Ala Gln Asp Leu Gly
115 120 125

agc acc ctg ttc tca gat gcc gtg cca cag cct cca tcg cag cca cct 432
Ser Thr Leu Phe Ser Asp Ala Val Pro Gln Pro Pro Ser Gln Pro Pro

130

135

140

cag atc ccg cct ccc gca ggc atg ggc gcc cag gcc aga cct ctt agt 480

Gln Ile Pro Pro Pro Ala Gly Met Gly Ala Gln Ala Arg Pro Leu Ser

145

150

155

160

gcc ctg caa ggc ttc ggc tac acg aag gag agc agc cgg aca ggc tcc 528

Ala Leu Gln Gly Phe Gly Tyr Thr Lys Glu Ser Ser Arg Thr Gly Ser

165

170

175

gca ggt gaa acc ttc ctc tcc acc atc cag agg gcc gca gag gta gtg 576

Ala Gly Glu Thr Phe Leu Ser Thr Ile Gln Arg Ala Ala Glu Val Val

180

185

190

gct aat gct gtg cgt cct gga cct gat aat cct tgt acc aag gga ccc 624

Ala Asn Ala Val Arg Pro Gly Pro Asp Asn Pro Cys Thr Lys Gly Pro

195

200

205

ttg ccg tat ggt gat tcc tac cag cct gca gtg aca cct tca gct agc 672

Leu Pro Tyr Gly Asp Ser Tyr Gln Pro Ala Val Thr Pro Ser Ala Ser

210

215

220

cac aca cat ccc aac cct ggg aat cta ctc cct ggg gcc atc ctg ggg 720

His Thr His Pro Asn Pro Gly Asn Leu Leu Pro Gly Ala Ile Leu Gly

225

230

235

240

gcc aga gct gtg aga cac cag ccc ggg cag gct ggg ggc ggc tgg gat 768

Ala Arg Ala Val Arg His Gln Pro Gly Gln Ala Gly Gly Gly Trp Asp

245

250

255

gag ctg gac agc agt cct agt tcc cag aat tcc tcc tgc acc agc aac 816
Glu Leu Asp Ser Ser Pro Ser Ser Gln Asn Ser Ser Cys Thr Ser Asn
260 265 270

ctg agc agg gcc tcg gac tcg ggc agt cgg tct ggc agt gac agc cac 864
Leu Ser Arg Ala Ser Asp Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Ser His
275 280 285

tct ggc acc agc cgg gag cca ggc gac ctg gca gaa agg gct gag gcc 912
Ser Gly Thr Ser Arg Glu Pro Gly Asp Leu Ala Glu Arg Ala Glu Ala
290 295 300

acg ccc cca aat gac tgc cag caa gaa ctg aat cta gtg agg act gtg 960
Thr Pro Pro Asn Asp Cys Gln Gln Glu Leu Asn Leu Val Arg Thr Val
305 310 315 320

aca cag ggg cca cgt gtc ttc ctg agc cgt gag gag acg cag cac ttc 1008
Thr Gln Gly Pro Arg Val Phe Leu Ser Arg Glu Glu Thr Gln His Phe
325 330 335

atc aaa gag tgt ggc ctg ctc aac tgt gag gca gtg ctg gag ctg ctc 1056
Ile Lys Glu Cys Gly Leu Leu Asn Cys Glu Ala Val Leu Glu Leu Leu
340 345 350

ctg cgc cag ctg gtc ggg acc agt gag tgc gag cag atg agg gcg ctg 1104
Leu Arg Gln Leu Val Gly Thr Ser Glu Cys Glu Gln Met Arg Ala Leu
355 360 365

tgt gcc atc gcg tcc ttt ggg agt gct gac ctc ctg cct cag gag cac 1152

Cys Ala Ile Ala Ser Phe Gly Ser Ala Asp Leu Leu Pro Gln Glu His

370

375

380

gtc ctc ctc ctg tgc cga cag cag ctg cag gaa ctt ggc gcg ggc agc 1200

Val Leu Leu Leu Cys Arg Gln Gln Leu Gln Glu Leu Gly Ala Gly Ser

385

390

395

400

cct gga cct gtg acc aac aaa gcc acc aag atc ctg aga cat ttt gaa 1248

Pro Gly Pro Val Thr Asn Lys Ala Thr Lys Ile Leu Arg His Phe Glu

405

410

415

gcc tcc tgt gga caa cag ctc cct acc cta agg ctc tgt gcc cag ccc 1296

Ala Ser Cys Gly Gln Gln Leu Pro Thr Leu Arg Leu Cys Ala Gln Pro

420

425

430

aac tct gca gct gcc cct gtg ggc cca gct gac ctg ctg acc agc ccc 1344

Asn Ser Ala Ala Ala Pro Val Gly Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ser Pro

435

440

445

gtg cct gcc cct ggg agc cag gtc tgc ctc cag cct ctc agc tcc gcc 1392

Val Pro Ala Pro Gly Ser Gln Val Cys Leu Gln Pro Leu Ser Ser Ala

450

455

460

aca gtg gta ccc agg agt cct gtg ctc ttt cca tcc ccc aat acc tta 1440

Thr Val Val Pro Arg Ser Pro Val Leu Phe Pro Ser Pro Asn Thr Leu

465

470

475

480

cct ccg tct gct ctg gag gag ccc agc gag gtc cga acc caa ttg gtg 1488

Pro Pro Ser Ala Leu Glu Glu Pro Ser Glu Val Arg Thr Gln Leu Val
 485 490 495

tgt tct agt gaa cag ggg aca gaa tct gag cag agg ctg gag aac aca 1536
 Cys Ser Ser Glu Gln Gly Thr Glu Ser Glu Gln Arg Leu Glu Asn Thr
 500 505 510

gac acc cca gag gat agc tcc agt ccg ctc ccg tgg agt ccc aac tct 1584
 Asp Thr Pro Glu Asp Ser Ser Ser Pro Leu Pro Trp Ser Pro Asn Ser
 515 520 525

ttg ttt gct ggc atg gag ctg gtg gct tgc ccc cgc ctg cct tgc cac 1632
 Leu Phe Ala Gly Met Glu Leu Val Ala Cys Pro Arg Leu Pro Cys His
 530 535 540

agc tcg cag gac ctc cag aca gat tta cag aag gtg acc aca gaa gct 1680
 Ser Ser Gln Asp Leu Gln Thr Asp Leu Gln Lys Val Thr Thr Glu Ala
 545 550 555 560

ccg gtt tca gag cca tca gct ttt gca ttt tta aac atg tga 1722
 Pro Val Ser Glu Pro Ser Ala Phe Ala Phe Leu Asn Met
 565 570

<210> 2

<211> 573

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Met Ala Ala Val Pro Pro Leu Arg Asp Arg Leu Ser Phe Leu His Arg
1 5 10 15

Leu Pro Ile Leu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Asp Ser Ile Pro Cys Pro
20 25 30

Gly Tyr Leu Phe Glu Glu Ile Ala Lys Ile Ser His Glu Ser Leu Gly
35 40 45

Ser Ser Gln Cys Leu Leu Glu Tyr Leu Leu Asn Arg Leu Asp Ser Ser
50 55 60

Ser Gly His Val Lys Leu Lys Val Leu Lys Ile Leu Leu Tyr Leu Cys
65 70 75 80

Gly His Gly Ser Ser Ser Phe Leu Leu Ile Leu Arg Arg Asn Ser Ala
85 90 95

Leu Ile Gln Glu Ala Thr Ala Phe Ser Gly Pro Pro Asp Pro Leu His
100 105 110

Gly Asn Ser Leu Tyr Gln Lys Val Arg Ala Ala Ala Gln Asp Leu Gly
115 120 125

Ser Thr Leu Phe Ser Asp Ala Val Pro Gln Pro Pro Ser Gln Pro Pro
130 135 140

Gln Ile Pro Pro Pro Ala Gly Met Gly Ala Gln Ala Arg Pro Leu Ser
145 150 155 160

Ala Leu Gln Gly Phe Gly Tyr Thr Lys Glu Ser Ser Arg Thr Gly Ser
165 170 175

Ala Gly Glu Thr Phe Leu Ser Thr Ile Gln Arg Ala Ala Glu Val Val
180 185 190

Ala Asn Ala Val Arg Pro Gly Pro Asp Asn Pro Cys Thr Lys Gly Pro
195 200 205

Leu Pro Tyr Gly Asp Ser Tyr Gln Pro Ala Val Thr Pro Ser Ala Ser
210 215 220

His Thr His Pro Asn Pro Gly Asn Leu Leu Pro Gly Ala Ile Leu Gly
225 230 235 240

Ala Arg Ala Val Arg His Gln Pro Gly Gln Ala Gly Gly Gly Trp Asp
245 250 255

Glu Leu Asp Ser Ser Pro Ser Ser Gln Asn Ser Ser Cys Thr Ser Asn
260 265 270

Leu Ser Arg Ala Ser Asp Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Ser His
275 280 285

Ser Gly Thr Ser Arg Glu Pro Gly Asp Leu Ala Glu Arg Ala Glu Ala
290 295 300

Thr Pro Pro Asn Asp Cys Gln Gln Glu Leu Asn Leu Val Arg Thr Val
305 310 315 320

Thr Gln Gly Pro Arg Val Phe Leu Ser Arg Glu Glu Thr Gln His Phe
325 330 335

Ile Lys Glu Cys Gly Leu Leu Asn Cys Glu Ala Val Leu Glu Leu Leu

340

345

350

Leu Arg Gln Leu Val Gly Thr Ser Glu Cys Glu Gln Met Arg Ala Leu
355 360 365

Cys Ala Ile Ala Ser Phe Gly Ser Ala Asp Leu Leu Pro Gln Glu His
370 375 380

Val Leu Leu Leu Cys Arg Gln Gln Leu Gln Glu Leu Gly Ala Gly Ser
385 390 395 400

Pro Gly Pro Val Thr Asn Lys Ala Thr Lys Ile Leu Arg His Phe Glu
405 410 415

Ala Ser Cys Gly Gln Gln Leu Pro Thr Leu Arg Leu Cys Ala Gln Pro
420 425 430

Asn Ser Ala Ala Ala Pro Val Gly Pro Ala Asp Leu Leu Thr Ser Pro
435 440 445

Val Pro Ala Pro Gly Ser Gln Val Cys Leu Gln Pro Leu Ser Ser Ala
450 455 460

Thr Val Val Pro Arg Ser Pro Val Leu Phe Pro Ser Pro Asn Thr Leu
465 470 475 480

Pro Pro Ser Ala Leu Glu Glu Pro Ser Glu Val Arg Thr Gln Leu Val
485 490 495

Cys Ser Ser Glu Gln Gly Thr Glu Ser Glu Gln Arg Leu Glu Asn Thr
500 505 510

Asp Thr Pro Glu Asp Ser Ser Ser Pro Leu Pro Trp Ser Pro Asn Ser
515 520 525

Leu Phe Ala Gly Met Glu Leu Val Ala Cys Pro Arg Leu Pro Cys His
530 535 540

Ser Ser Gln Asp Leu Gln Thr Asp Leu Gln Lys Val Thr Thr Glu Ala
545 550 555 560

Pro Val Ser Glu Pro Ser Ala Phe Ala Phe Leu Asn Met
565 570

<210> 3

<211> 1782

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1782)

<400> 3

atg gct gcc gcg ccg ccg cta cgg gac cgc ctg agc ttt cta cac cgg 48

Met Ala Ala Ala Pro Pro Leu Arg Asp Arg Leu Ser Phe Leu His Arg

1 5 10 15

ctc ccg att ctc ctg aag ggg acg tcc gat gat gat gtc ccg tgt ccg 96

Leu Pro Ile Leu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Asp Asp Val Pro Cys Pro

20 25 30

ggc tac ctg ttt gaa gag att gct aaa atc tcc cac gag tct ccg ggc 144

Gly Tyr Leu Phe Glu Glu Ile Ala Lys Ile Ser His Glu Ser Pro Gly

35 40 45

agc agc cag tgc ctg ctg gag tac ctc ctg agc cgc ctg cac agc agc 192

Ser Ser Gln Cys Leu Leu Glu Tyr Leu Leu Ser Arg Leu His Ser Ser

50 55 60

tcc ggc cac ggg aag ctc aag gtg ctg aag atc ctg ctc tat ctg tgc 240

Ser Gly His Gly Lys Leu Lys Val Leu Lys Ile Leu Leu Tyr Leu Cys

65	70	75	80	
agc cac ggc tcc tcc ttc ttc ctg ctc atc ctc aaa cgc aac tct gcc Ser His Gly Ser Ser Phe Phe Leu Leu Ile Leu Lys Arg Asn Ser Ala				288
	85	90	95	
ttc atc cag gaa gct gca gct ttt gca ggg ccc cca gat cct ctg cac Phe Ile Gln Glu Ala Ala Ala Phe Ala Gly Pro Pro Asp Pro Leu His				336
	100	105	110	
ggg aac agc ttg tac cag aag gtt cgc gcg gcc gcg cag gac ttg ggg Gly Asn Ser Leu Tyr Gln Lys Val Arg Ala Ala Ala Gln Asp Leu Gly				384
	115	120	125	
agc acc ctg ttc tcg gac acc gtg ttg ccg ctg gct ccc tcc cag cct Ser Thr Leu Phe Ser Asp Thr Val Leu Pro Leu Ala Pro Ser Gln Pro				432
	130	135	140	
ctg ggg acc ccg cct gcc aca ggc atg ggc tcc cag gcc agg ccg cac Leu Gly Thr Pro Pro Ala Thr Gly Met Gly Ser Gln Ala Arg Pro His				480
	145	150	155	160
agc acc ctc cag ggt ttc ggc tac agc aag gaa cac ggc cgc acg ggc Ser Thr Leu Gln Gly Phe Gly Tyr Ser Lys Glu His Gly Arg Thr Gly				528
	165	170	175	
tcg gca ggc gaa gcc ttc ctc tcc acc atc cag aag gcc gca gag gtg Ser Ala Gly Glu Ala Phe Leu Ser Thr Ile Gln Lys Ala Ala Glu Val				576
	180	185	190	

gtg gcc agc gcc atg cgc ccc ggg ccc gag agt ccc agt acc cgg agg 624

Val Ala Ser Ala Met Arg Pro Gly Pro Glu Ser Pro Ser Thr Arg Arg

195

200

205

ctc ctg ccg cgg ggt gac acc tac cag cct gcc atg atg cct tca gcc 672

Leu Leu Pro Arg Gly Asp Thr Tyr Gln Pro Ala Met Met Pro Ser Ala

210

215

220

agc cac ggt ccc cca acc ctg ggg aac cta ctc ccc ggg gcc att cca 720

Ser His Gly Pro Pro Thr Leu Gly Asn Leu Leu Pro Gly Ala Ile Pro

225

230

235

240

ggt ccc cga gct gtg agg cat cag cct ggg cag gcc gga ggg ggc tgg 768

Gly Pro Arg Ala Val Arg His Gln Pro Gly Gln Ala Gly Gly Gly Trp

245

250

255

gat gag ctg gac agc ggc ccc agc tct cag aat tcc tcc cag aac agc 816

Asp Glu Leu Asp Ser Gly Pro Ser Ser Gln Asn Ser Ser Gln Asn Ser

260

265

270

gac ctg agc agg gtc tcg gac tcg ggc agt cat tcc ggc agc gac agc 864

Asp Leu Ser Arg Val Ser Asp Ser Gly Ser His Ser Gly Ser Asp Ser

275

280

285

cat tca ggg gcc agc cgg gag ccg ggt gac ctg gca gaa agg gtc gag 912

His Ser Gly Ala Ser Arg Glu Pro Gly Asp Leu Ala Glu Arg Val Glu

290

295

300

gtg gtg gcc ctg agt gac tgt cag cag gag ttg agc ttg gtg agg act 960
 Val Val Ala Leu Ser Asp Cys Gln Gln Glu Leu Ser Leu Val Arg Thr
 305 310 315 320

gtg act cgg gga cca cgc gcc ttc ctg agc cgc gag gag gca cag cac 1008
 Val Thr Arg Gly Pro Arg Ala Phe Leu Ser Arg Glu Glu Ala Gln His
 325 330 335

ttc atc aaa gcg tgt gga ctg ctc aac tgt gag gcc gtg ctg cag ctg 1056
 Phe Ile Lys Ala Cys Gly Leu Leu Asn Cys Glu Ala Val Leu Gln Leu
 340 345 350

ctg acc tgc cac ctg cgt ggg acc agt gaa tgc acg cag ctg agg gcg 1104
 Leu Thr Cys His Leu Arg Gly Thr Ser Glu Cys Thr Gln Leu Arg Ala
 355 360 365

ctg tgt gcc atc gcc tcc ctg ggg agc agc gac ctc ctc ccc cag gag 1152
 Leu Cys Ala Ile Ala Ser Leu Gly Ser Ser Asp Leu Leu Pro Gln Glu
 370 375 380

cac atc ctc ctc cgc acc cgg ccg tgg ctg cag gag ctc agc atg ggc 1200
 His Ile Leu Leu Arg Thr Arg Pro Trp Leu Gln Glu Leu Ser Met Gly
 385 390 395 400

agc ccg gga cct gtg acc aac aag gcc acc aag atc ctg agg cac ttt 1248
 Ser Pro Gly Pro Val Thr Asn Lys Ala Thr Lys Ile Leu Arg His Phe
 405 410 415

gag gcc tcc tgt ggg cag ctg tcc cct gcc cgg ggc acc tca gct gag 1296

Glu Ala Ser Cys Gly Gln Leu Ser Pro Ala Arg Gly Thr Ser Ala Glu
 420 425 430

cct ggc ccc aca gcc gcc ctc cca ggc cca tct gac ctg ctg acc gac 1344
 Pro Gly Pro Thr Ala Ala Leu Pro Gly Pro Ser Asp Leu Leu Thr Asp
 435 440 445

gct gtg cct ctc cct ggg agc cag gtc ttc ctg cag cct ctg agt tca 1392
 Ala Val Pro Leu Pro Gly Ser Gln Val Phe Leu Gln Pro Leu Ser Ser
 450 455 460

acc ccg gtc tcg tcc cgg agc cct gct ccc tca tct ggg atg ccg tcc 1440
 Thr Pro Val Ser Ser Arg Ser Pro Ala Pro Ser Ser Gly Met Pro Ser
 465 470 475 480

agc cct gtg ccc acc cca ccc cca gat gcc tcc ccc att cca gcc ccc 1488
 Ser Pro Val Pro Thr Pro Pro Pro Asp Ala Ser Pro Ile Pro Ala Pro
 485 490 495

gga gac ccc agc gag gcc gag gcc aga ctg gca gaa agc agg cgg tgg 1536
 Gly Asp Pro Ser Glu Ala Glu Ala Arg Leu Ala Glu Ser Arg Arg Trp
 500 505 510

aga cct gaa cgg atc ccg ggg ggc acg gac agc cca aag aga ggc ccc 1584
 Arg Pro Glu Arg Ile Pro Gly Gly Thr Asp Ser Pro Lys Arg Gly Pro
 515 520 525

agc agc tgt gcg tgg agc cgc gac tcc ttg ttt gct ggc atg gag ctg 1632
 Ser Ser Cys Ala Trp Ser Arg Asp Ser Leu Phe Ala Gly Met Glu Leu

530

535

540

gtg gcc tgt ccc cgc ctg gtg ggg gct ggg gct gct gcg gga gag tcc 1680
Val Ala Cys Pro Arg Leu Val Gly Ala Gly Ala Ala Ala Gly Glu Ser
545 550 555 560

tgt cct gat gct ccc cgc gcc ccc caa aca tcg tcc cag agg aca gca 1728
Cys Pro Asp Ala Pro Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ser Gln Arg Thr Ala
565 570 575

gcc aaa gag cct cct ggc tca gag ccg tca gct ttc gcg ttc ctg aac 1776
Ala Lys Glu Pro Pro Gly Ser Glu Pro Ser Ala Phe Ala Phe Leu Asn
580 585 590

gcc tga 1782
Ala

<210> 4

<211> 593

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Ala Ala Pro Pro Leu Arg Asp Arg Leu Ser Phe Leu His Arg

1

5

10

15

Leu Pro Ile Leu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Asp Asp Val Pro Cys Pro
20 25 30

Gly Tyr Leu Phe Glu Glu Ile Ala Lys Ile Ser His Glu Ser Pro Gly
35 40 45

Ser Ser Gln Cys Leu Leu Glu Tyr Leu Leu Ser Arg Leu His Ser Ser
50 55 60

Ser Gly His Gly Lys Leu Lys Val Leu Lys Ile Leu Leu Tyr Leu Cys
65 70 75 80

Ser His Gly Ser Ser Phe Phe Leu Leu Ile Leu Lys Arg Asn Ser Ala
85 90 95

Phe Ile Gln Glu Ala Ala Ala Phe Ala Gly Pro Pro Asp Pro Leu His
100 105 110

Gly Asn Ser Leu Tyr Gln Lys Val Arg Ala Ala Ala Gln Asp Leu Gly
115 120 125

Ser Thr Leu Phe Ser Asp Thr Val Leu Pro Leu Ala Pro Ser Gln Pro
130 135 140

Leu Gly Thr Pro Pro Ala Thr Gly Met Gly Ser Gln Ala Arg Pro His
145 150 155 160

Ser Thr Leu Gln Gly Phe Gly Tyr Ser Lys Glu His Gly Arg Thr Gly
165 170 175

Ser Ala Gly Glu Ala Phe Leu Ser Thr Ile Gln Lys Ala Ala Glu Val
180 185 190

Val Ala Ser Ala Met Arg Pro Gly Pro Glu Ser Pro Ser Thr Arg Arg
195 200 205

Leu Leu Pro Arg Gly Asp Thr Tyr Gln Pro Ala Met Met Pro Ser Ala
210 215 220

Ser His Gly Pro Pro Thr Leu Gly Asn Leu Leu Pro Gly Ala Ile Pro
225 230 235 240

Gly Pro Arg Ala Val Arg His Gln Pro Gly Gln Ala Gly Gly Gly Trp

245

250

255

Asp Glu Leu Asp Ser Gly Pro Ser Ser Gln Asn Ser Ser Gln Asn Ser

260

265

270

Asp Leu Ser Arg Val Ser Asp Ser Gly Ser His Ser Gly Ser Asp Ser

275

280

285

His Ser Gly Ala Ser Arg Glu Pro Gly Asp Leu Ala Glu Arg Val Glu

290

295

300

Val Val Ala Leu Ser Asp Cys Gln Gln Glu Leu Ser Leu Val Arg Thr

305

310

315

320

Val Thr Arg Gly Pro Arg Ala Phe Leu Ser Arg Glu Glu Ala Gln His

325

330

335

Phe Ile Lys Ala Cys Gly Leu Leu Asn Cys Glu Ala Val Leu Gln Leu

340

345

350

Leu Thr Cys His Leu Arg Gly Thr Ser Glu Cys Thr Gln Leu Arg Ala

355

360

365

Leu Cys Ala Ile Ala Ser Leu Gly Ser Ser Asp Leu Leu Pro Gln Glu
370 375 380

His Ile Leu Leu Arg Thr Arg Pro Trp Leu Gln Glu Leu Ser Met Gly
385 390 395 400

Ser Pro Gly Pro Val Thr Asn Lys Ala Thr Lys Ile Leu Arg His Phe
405 410 415

Glu Ala Ser Cys Gly Gln Leu Ser Pro Ala Arg Gly Thr Ser Ala Glu
420 425 430

Pro Gly Pro Thr Ala Ala Leu Pro Gly Pro Ser Asp Leu Leu Thr Asp
435 440 445

Ala Val Pro Leu Pro Gly Ser Gln Val Phe Leu Gln Pro Leu Ser Ser
450 455 460

Thr Pro Val Ser Ser Arg Ser Pro Ala Pro Ser Ser Gly Met Pro Ser
465 470 475 480

Ser Pro Val Pro Thr Pro Pro Pro Asp Ala Ser Pro Ile Pro Ala Pro
485 490 495

Gly Asp Pro Ser Glu Ala Glu Ala Arg Leu Ala Glu Ser Arg Arg Trp
500 505 510

Arg Pro Glu Arg Ile Pro Gly Gly Thr Asp Ser Pro Lys Arg Gly Pro
515 520 525

Ser Ser Cys Ala Trp Ser Arg Asp Ser Leu Phe Ala Gly Met Glu Leu
530 535 540

Val Ala Cys Pro Arg Leu Val Gly Ala Gly Ala Ala Ala Gly Glu Ser
545 550 555 560

Cys Pro Asp Ala Pro Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ser Gln Arg Thr Ala
565 570 575

Ala Lys Glu Pro Pro Gly Ser Glu Pro Ser Ala Phe Ala Phe Leu Asn
580 585 590

Ala

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized p
rimer sequence

<400> 5

cgtaccacgc tgccaccatg aatgagg

27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized p
rimer sequence

<400> 6

gcagcgagcg tgcgtcctct gcgtggg

27

<210> 7

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized p
rimer sequence

<400> 7

agagagtagt aacaaaggct aaagacagtt gactgtatcg atgaatgagg tgtctgtcat 60

c

61

<210> 8

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized p
rimer sequence

<400> 8

tggagacttg accaaacctc tggcgaagaa gtccaaagct tcactcgcgg gatgctggc 59

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: the sequence of 5183th(5') to 5162th(3') bases in Cloning vector pACT2(GenBank U29899)

<400> 9

cgcgtttgga atcactacag gg

22

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

cagttgagca ggccacactc tttg

24

<210> 11

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

taatacgact ataggg

16

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

atggcagctg tgccgccc

18

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

catgtttaaa aatgcaaaag c

21

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

catgtccagg ctacctgttt ga

22

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

caggcactgg ctgctgc

17

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized p
rimer sequence

<400> 16

aaagtggaga ttgttgccat

20

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized p
rimer sequence

<400> 17

ttgactgtgc cgttgaatt

19

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized p
rimer sequence

<400> 18

atggctgccg cgccgcc

17

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized p
rimer sequence

<400> 19

ggcgttcagg aacgcgaaag

20

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 20

gactgtgact cggggacc

18

【0027】

【図面の簡単な説明】

【図1】

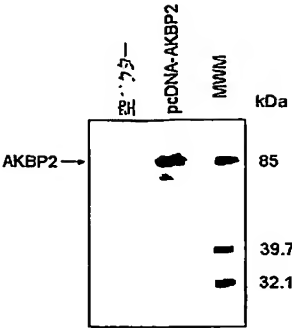
培養細胞におけるAKBP2の発現を示す図である。MWMは分子量マーカールを示している。

【図2】

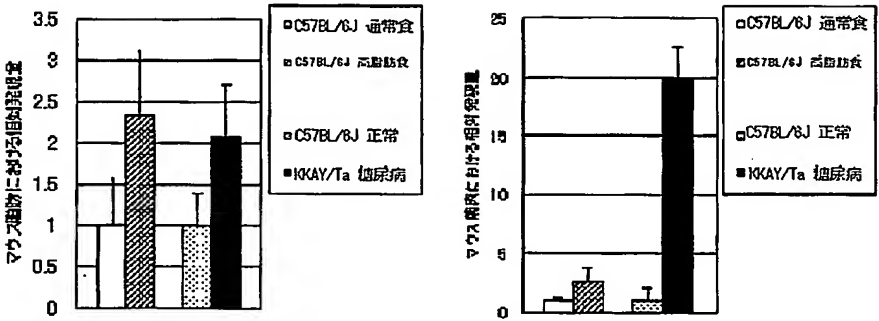
(1) 通常食又は高脂肪食負荷した正常マウスC57BL/6Jにおける脂肪でのAKBP2発現量の比較、並びに (2) 正常マウスC57BL/6J及び糖尿病モデルマウスKKAY/Taにおける筋肉でのAKBP2発現量の比較を示す図である。(1)の比較においては通常食のC57BL/6Jの発現量を、(2)の比較においてはC57BL/6Jの発現量を、それぞれ1として表示している。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、Akt2の制御因子を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明者らは、Akt2に結合する蛋白質を、酵母ツーハイブリッドシステムにより同定した。その結果、脂肪で発現する蛋白質AKBP2をコードする新規な塩基配列のcDNAのクローニングに成功した。さらに同蛋白質のmRNAは糖尿病モデルマウスの脂肪及び筋肉において発現量が顕著に増加していることから同蛋白質が糖尿病態の原因因子であることを見出し、本発明を完成した。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-354155
受付番号	50201845360
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年12月 6日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年12月 5日

次頁無

特願 2 0 0 2 - 3 5 4 1 5 5

ページ： 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 6 6 7 7]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町 2 丁目 3 番 1 1 号

氏 名

山之内製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **KEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.